

REGULACIÓN DE LOS MECANISMOS DE ABSORCIÓN DEL Fe EN CÍTRICOS EN FUNCIÓN DE DIFERENTES GENOTIPOS Y SU DISPONIBILIDAD EN EL MEDIO DE CULTIVO

Centro de Citricultura and
Producción Vegetal.
Instituto Valenciano de
Investigaciones Agrarias (IVIA).
Moncada, Valencia, España.
e-mail: martinez_mru@gva.es

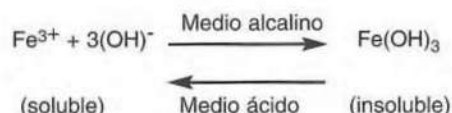
Resumen

La deficiencia de hierro es una fisiopatía común en los cítricos de la zona mediterránea debido al predominio de suelos calizos que tiene importantes repercusiones agronómicas. El estudio de la absorción con el isótopo no radiactivo ^{57}Fe reveló que la tasa de absorción aumentó linealmente con la concentración creciente de éste en el sustrato. Entre patrones, el Cleopatra el patrón con mayor capacidad de absorción, lo que explicaría su mayor eficiencia y tolerancia a la clorosis. Adicionalmente, el cultivo de plántulas de cítricos *in vitro* indicó que la capacidad de asimilación del hierro es altamente dependiente del pH del suelo, encontrándose un máximo de absorción a pHs ácidos. La extrusión de protones al medio para solubilizar el ión férrico, así como la liberación o exudación de ácidos orgánicos se configuraron como estrategias altamente desarrolladas en genotipos sensibles a la clorosis férrica y más en deficiencia de hierro. Los análisis enzimáticos y moleculares sugieren que la capacidad de reducción de las formas férricas a ferrosas se indujo significativamente en condiciones de déficit de hierro, en ambos patrones, y que el transportador de este elemento al interior de la planta se mostró más activo en el patrón más sensible, induciéndose su expresión de un modo muy significativo en condiciones deficitarias.

Palabras clave: Ácidos orgánicos, Cítricos, Clorosis férrica, Patrón, Protón-ATPasa, Quelato-Reductasa Férrica, Transportador férrico.

INTRODUCCIÓN

El hierro (Fe) es el cuarto elemento químico más abundante de la corteza terrestre, tras el oxígeno, el silicio y el aluminio. En el suelo se presenta en dos posibles estados de oxidación: férrico (Fe^{3+}) y ferroso (Fe^{2+}), de manera que en condiciones ácidas y no oxidantes es característico el predominio de la forma Fe^{2+} . Sin embargo, en presencia de oxígeno y en medio alcalino, el Fe^{2+} es oxidado rápidamente a Fe^{3+} , y puede precipitar en forma de óxidos e hidróxidos de Fe insolubles ($\text{Fe}(\text{OH})_3$), así como algunas formas intermedias tales como $\text{Fe}(\text{OH})_2^+$ o $\text{Fe}(\text{OH})_2^+$. Por tanto, la solubilidad del Fe en la solución del suelo es altamente dependiente del pH del mismo (Legaz *et al.*, 1995):



El descenso del pH en una sola unidad puede incrementar la solubilidad de los compuestos de hierro hasta 1000 veces (Lindsay, 1995) mejorando, de esta forma, la movilización de este elemento en el sustrato. Por otra parte, es bien conocido que la composición del suelo afecta a la disponibilidad de este elemento en el medio. Así, los iones Fe^{3+} pueden adsorberse a las arcillas, donde una fracción de éstos queda fuertemente fijada.

El Fe participa en procesos clave del desarrollo de las plantas, como por ejemplo la respiración, la fotosíntesis y generación de pigmentos fotosintéticos, el metabolismo del nitrógeno, etc., a lo que se suma que algunos enzimas fundamentales necesitan del hierro para desempeñar su función. Una parte de este elemento se acumula en las hojas, unido a una fosfoproteína que se denomina fitoferritina, localizada principalmente en los cloroplastos.

Las plantas incorporan preferentemente el Fe en forma de Fe^{2+} directamente de la disolución del suelo mediante un proceso de absorción activa a través de las raíces (Uren, 1984). Cuando la cantidad de Fe a disposición de la planta es suficiente, éstas lo absorben tras la reducción del Fe^{3+} a Fe^{2+} mediante una enzima denominada **reductasa** estándar. Sin embargo, en condiciones de deficiencia de Fe las plantas han desarrollado dos estrategias para movilizar los micronutrientes del suelo (Römheld and Marschner, 1986;

Marschner and Römheld, 1994; Schmidt, 1999; Kim and Guerinot, 2007). La más extendida, conocida como estrategia I (Figura 1, pág. 82), es propia de las plantas monocotiledóneas no gramíneas y dicotiledóneas, y la solubilización del Fe se produce mediante una disminución del pH en la rizosfera, promoviendo su reducción a Fe^{2+} antes de atravesar la membrana celular por medio de proteínas reductoras asociadas a las membranas celulares. La disminución en el pH se debe a una excreción activa de protones mediada por una **ATPasa** asociada a la membrana plasmática (De Vos *et al.*, 1986; Rabotti *et al.*, 1995; Wei *et al.*, 1997; Dell'Orto *et al.*, 2000; Dell'Orto *et al.*, 2002; Santi *et al.*, 2005) y, en menor medida, de una mezcla compleja de **ácidos orgánicos**, principalmente citrato y malato, los cuales también pueden funcionar como agentes quelantes de Fe para su transporte a lo largo de la planta (Römheld and Marschner, 1983; Abadía *et al.*, 2002). Asociada al proceso de acidificación, las plantas llevan a cabo la reducción del

Fe^{3+} solubilizado a Fe^{2+} mediante la participación de **reductasas de los complejos Fe-quelato**, que son proteínas asociadas a las membranas que actúan en procesos independientes de la extrusión de protones (Susín *et al.*, 1996; Yi and Guerinot, 1996; Pestana *et al.*, 2001; Rombolá *et al.*, 2002; Chouliaras *et al.*, 2004; Molassiotis *et al.*, 2006). La reducción del Fe^{3+} unido al quelato requiere la transferencia de electrones desde el citosol a través de la membrana plasmática y, en este sentido, las plantas con estrategia I poseen dos sistemas subcelulares de transferencia de electrones, un sistema "estándar" y un sistema "turbo" de alta eficiencia reductor de distintos complejos Fe-quelato, que es inducido en condiciones de déficit de Fe. En este sistema turbo se encuentra la **enzima Fe-quelato reductasa (F-CR)**, que es utilizada por la mayoría de las plantas para adquirir Fe soluble (Bienfait *et al.*, 1983; Yi and Guerinot, 1996; Cohen *et al.*, 1998). Finalmente, la absorción de Fe^{2+} por las plantas con estrategia I puede ser en forma complejada con ligandos de bajo peso molecular o bien en la forma iónica libre, siendo esta última la más común. El principal transportador de Fe^{2+} en forma iónica libre es una proteína denominada **IRT** (Iron-Regulated Transporter) asociada a la membrana, que se ha constituido como elemento clave del transporte del Fe en los vegetales (Eide *et al.*, 1996; Cohen *et al.*, 1998).

Aunque la mayor parte de los suelos contienen cantidades considerables de Fe, que serían suficientes para atender las necesidades de los cultivos, ya se ha descrito que debido a las particularidades de los suelos -predominantemente calizos en especial en la Comunidad Valenciana-, una gran proporción se encuentra en formas insolubles y/o inasimilables por la planta. Más aún, el poder clorosante de muchos suelos se correlaciona más con su contenido en "caliza activa" que con el de carbonatos totales. Adicionalmente, es conocido que el exceso de agua debida al riego o lluvias abundantes incrementa la clorosis férrica en los terrenos calizos. También el medio ácido puede provocar la liberación a la solución del suelo de una cantidad excesiva de iones manganeso, zinc o cobre, que es una causa frecuente de deficiencia de Fe en la planta, siendo también un motivo común de la clorosis férrica en suelos pobres en este elemento y muy ricos en cualquiera de esos otros

minerales. Evidentemente, aquellos factores endógenos que inhiben la absorción de este elemento, como es el caso de bajos niveles de potasio y azufre y también la presencia de elevadas concentraciones de fósforo y de otros metales como manganeso, cobre, cinc, cadmio, plomo, cobalto, cromo y níquel, pueden contribuir también a la aparición de deficiencias de Fe en los cultivos. Otros factores endógenos indirectos, especialmente aquellos que inhiben el crecimiento de la raíz, como sería el caso de las bajas temperaturas, herbicidas, encharcamiento de los suelos, enmiendas orgánicas y presencia de bicarbonato, pueden afectar marcadamente a la absorción de hierro. Algunos trabajos han apuntado la importancia no sólo de la abundancia de Fe en el interior de la planta, sino también de su distribución en los distintos tejidos vegetales, ya que en muchas ocasiones, aunque presente, se encuentra "inactivado" en el interior de la planta (Mengel, 1994; Römhild, 2000).

La Citricultura es uno de los sectores de la fruticultura con mayor producción a nivel mundial, superando los 116,5 millones de toneladas en el año 2013 (FAO, 2014). España es el sexto productor mundial y el primer exportador de cítricos para consumo en fresco hasta el punto que en el año 2013 la superficie dedicada al cultivo de cítricos en España fue de 299.478 ha en producción (MAGRAMA, 2014), distribuidas a lo largo de la franja costera mediterránea, especialmente la Comunidad Valenciana, Murcia y Andalucía, así como el sur de la Comunidad Catalana. Los estreses abióticos -o condiciones medioambientales adversas- son uno de los factores más importantes en la disminución de la producción agrícola y, particularmente, es importante el hecho de que en la región mediterránea los cítricos se cultivan a menudo en suelos calcáreos de pH alto, lo que provoca desequilibrios nutricionales en las plantas.

La sintomatología de la deficiencia de Fe en cítricos se manifiesta principalmente en las hojas, que pierden su color verde intenso y evolucionan hacia tonos que van desde el verde claro hasta el amarillo pálido, según la intensidad de la afección (Legaz *et al.*, 1995; Legaz *et al.*, 2008). Es característico que en las nerviaciones de las hojas se mantenga el color verde oscuro y aparezcan remarcadas sobre un fondo más claro, semejando una especie

de malla o retículo (Figura 2, pág. 82). Las hojas que sufren una fuerte deficiencia suelen alcanzar un menor desarrollo y tienden a caer prematuramente. La carencia de Fe se manifiesta en las nuevas brotaciones, incluso cuando éstas están en fase de desarrollo, como consecuencia de la escasa translocación de este elemento desde las hojas adultas u otros órganos. Como consecuencia, las brotaciones vegetativas son progresivamente menos vigorosas y sus hojas más pequeñas. En estas condiciones, suele producirse una defoliación anticipada de los brotes que provoca la muerte de los mismos, en un proceso progresivo que comienza por su zona apical. En los niveles de deficiencia aguda, los frutos maduros suelen ser de menor tamaño, con la piel suave y falta de color. Es característico que el flavedo de las naranjas y mandarinas quede de color amarillento, sin alcanzar las tonalidades anaranjadas-rojizas de los frutos normales (Figura 3, pág. 82). Adicionalmente, la carencia de Fe disminuye el contenido en sólidos solubles totales del zumo.

No todas las especies y/o variedades de cítricos presentan igual comportamiento en medios clorosantes, principalmente debido a las diferencias en su resistencia a la caliza activa. Así, el naranjo amargo es conocido por su buena resistencia a la caliza y condiciones adversas del suelo, sin embargo su elevada sensibilidad a la "tristeza" ha obligado a descartarlo en las plantaciones de cítricos. También son patrones resistentes el mandarino Cleopatra y el mandarino King. Así mismo, son muy evidentes las diferencias en el comportamiento de las distintas variedades. En este sentido, el limonero es más sensible que el naranjo. Entre las variedades de naranja, destaca notablemente por su resistencia la Navelina, Navelate y Valencia Late, seguidas por el grupo Navel (Washington y Thompson). Entre los mandarinos, Satsuma muestra una mayor tolerancia y las clementinas se encuentran entre las variedades más afectadas.

En este trabajo se presentan resultados acerca de los mecanismos de absorción del Fe del sustrato por dos patrones de cítricos que difieren en su sensibilidad a la clorosis férrica, mandarino Cleopatra y citrange Carrizo, y se examinan las diferencias en su capacidad de asimilación del elemento en función del pH del suelo. Por otro lado, se describen las estrategias

para solubilizar las formas férricas de la solución del suelo, especialmente en condiciones de deficiencia de Fe, y también se apuntan las diferencias existentes entre los dos patrones considerados. Finalmente, se estudian las actividades enzimáticas clave de los procesos metabólicos mencionados, conjuntamente con la expresión de los genes que codifican dichos enzimas, y su papel en los procesos de absorción, reducción y transporte al interior de la planta.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para el desarrollo del presente estudio se utilizaron dos patrones ampliamente empleados en las plantaciones cítricas valencianas, conocidos por sus diferencias en la tolerancia a la clorosis férrica, el mandarino Cleopatra (*Citrus reshni* Hort. ex Tan.) y citrange Carrizo (*Citrus sinensis* L. Osb. x *Poncirus trifoliata* L.), tolerante y sensible, respectivamente. Se germinaron semillas de ambos patrones en cámara de germinación. A los dos meses se transplantaron individualmente a contenedores de 0,5 L de capacidad con arena y se cultivaron en condiciones controladas de invernadero. Cada grupo de plantas de un patrón se dividió en dos bloques homogéneos y se regaron dos veces semanalmente durante 4 meses con solución nutritiva con presencia (20 μ M Fe) en forma de quelato o ausencia de Fe.

En el estudio de la tasa de absorción de hierro se utilizaron las plantas previamente tratadas con y sin Fe de los dos patrones. Se realizaron 6 tratamientos con una solución nutritiva, que como fuente de Fe se aplicó un quelato orto-orto (^{57}Fe -o-o-EDDHA) enriquecido al 95,6% con el isótopo estable ^{57}Fe , con concentraciones crecientes de 0,01 a 1 mM. Las plantas se dividieron en grupos de 10 individuos y se hicieron 3 réplicas por tratamiento. Se mantuvieron 10 minutos en las soluciones marcadas con este isótopo, y después se fraccionaron en parte aérea y sistema radical. Para determinar la tasa de absorción de Fe del sistema radical se analizó el enriquecimiento en ^{57}Fe de este órgano, mediante un espectrofotómetro de masas con colector múltiple de acoplamiento inductivo de alta resolución. A los resultados obtenidos con este equipo analítico se les resta la abundancia natural de este isótopo (2,20% de ^{57}Fe) y el exceso o enriquecimiento en la concentración del isótopo que indica cuantitativamente la

absorción neta de Fe del fertilizante se utilizó para calcular dicha tasa.

Dado que, como ya se ha comentado, la capacidad de asimilación del Fe es altamente dependiente del pH del suelo, se estudió la tasa de absorción de Fe en soluciones ajustadas a diferentes pHs (4,5 a 8,5) en el patrón citrange Carrizo. El Fe se aplicó durante 5 minutos utilizando el mismo quelato ^{57}Fe -o-o-EDDHA descrito anteriormente.

Con objeto de determinar la **capacidad de acidificación del medio**, se seleccionaron tres grupos homogéneos de plantas para cada patrón y cada estado nutricional (plantas previamente tratadas con y sin Fe) y se introdujeron en una solución nutritiva sin Fe ajustada a pH 8,5. Los recipientes se cubrieron con papel de aluminio para evitar la incidencia de la luz en las raíces. La acidificación del medio se determinó midiendo el pH de la solución cada hora.

La **concentración de ácidos orgánicos**, principalmente citrato y malato, se midió en la savia del sistema radicular de las plántulas. Éstas se cortaron 5 cm por encima de las primeras raíces y todo el sistema radical se introdujo en una cámara de presión, aplicando una presión de 2 MPa durante 5 minutos. Paralelamente, en los ensayos de exudación de ácidos orgánicos se utilizaron grupos de 5 plantas de cada tratamiento previo, sin y con presencia de Fe, se lavaron con agua destilada y se introdujeron en 50 mL de solución ajustada a pH 7,0. Las plántulas se incubaron durante 1, 3, 6 y 12 h en una cámara de cultivo en condiciones controladas (27 °C, 80% HR y suplemento de luz: 50 μ mol m⁻² s⁻¹, 400-700 nm). Del mismo modo, otros grupos de plantas también se incubaron en una solución tampón ajustada a pH 5,0. La concentración de ácidos orgánicos en las muestras de savia y exudados se determinó mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC).

La **capacidad reductora de las raíces** se determinó con el análisis de la actividad de la enzima Fe-quelato reductasa (F-CR). Para ello, se incubaron fragmentos de raíces en una solución con presencia de Fe aplicado en forma férrica (Fe-EDTA) y se añadió al medio de reacción un indicador colorimétrico (BPDS). La enzima reduce el Fe^{3+} , el reactivo com-

pleja con el Fe^{2+} y el medio vira a color rosado, realizando la cuantificación mediante un espectrofotómetro. Este ensayo se realizó también sobre los dos patrones y ambos estados nutricionales. Para determinar la cinética de la enzima se aplicaron concentraciones crecientes de sustrato Fe-EDTA en el medio de 0,01 a 250 mM.

Finalmente, el **análisis de la expresión génica** se realizó mediante RT-PCR (Real-Time PCR), con objeto de determinar las diferencias entre patrones y tratamientos previos, con presencia o ausencia en la solución nutritiva, respecto de la actividad de la enzima protón-ATPasa, descrita anteriormente por ser la responsable de la liberación de protones y, por tanto, de la acidificación de la rizosfera y del transportador IRT encargado de absorber el hierro en estado ferroso presente en el entorno de la raíz.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

a) Tasa de absorción del hierro en función de su concentración en el medio de cultivo

Los resultados de este ensayo mostraron que la tasa de absorción del ion Fe^{2+} en la raíz aumentó linealmente con la concentración de este ion en el sustrato, ajustándose a tendencias lineales de una manera muy significativa (Figura 4, pág. 80). Aunque en ambos casos, la absorción aumentó en condiciones de ausencia de Fe en el medio, el m. Cleopatra mostró una respuesta más acusada, lo que explicaría su mayor eficiencia y tolerancia a la clorosis. ¿Qué estudio? Martínez-Cuenca *et al.* (2013a) revelaron que existen marcadas diferencias entre patrones en la absorción del hierro ^{57}Fe dependiendo de la disponibilidad (presencia o ausencia) de este elemento en el medio de cultivo. En línea con estos resultados, Fox *et al.* (1996) obtuvieron un aumento de la absorción de Fe en plantas de guisante inducida por la deficiencia de Fe, mediante el uso de un quelato enriquecido en ^{59}Fe . Y en cítricos, Manthey *et al.* (1994) ya observaron que el ^{55}Fe transportado a los tallos y hojas era proporcional al Fe activamente absorbido por las raíces, en un ensayo realizado en plantas expuestas durante 3 días a ^{55}Fe HEDTA.

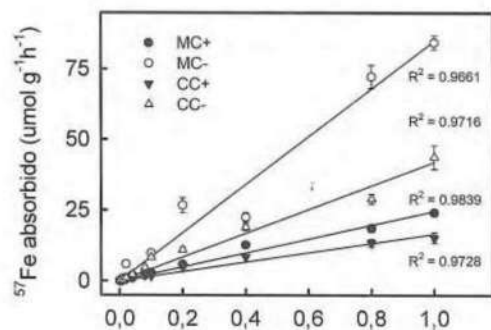


Figura 4. Absorción de hierro en función de la concentración de $^{57}\text{FeEDDHA}$ en el medio externo medido en plántulas de m. Cleopatra (MC) y c. Carrizo (CC). En ambos patrones, la ausencia de Fe (-) incrementó marcadamente la absorción de este elemento en relación con la presencia de Fe (+) en la solución nutritiva aplicada al cultivo de las plántulas previo a los tratamientos, si bien este aumento fue mayor en el patrón más tolerante.

b) Tasa de absorción del hierro función del pH del medio de cultivo

La absorción incrementó al reducirse el pH, siendo el máximo de absorción a pHs muy ácidos, inviables para cualquier cultivo. Por otra parte, los tratamientos a pHs superiores a 5.0 redujeron la absorción a la mitad (Figura 5). En este ensayo se confirmó que la capacidad de asimilación del hierro en los cítricos es altamente dependiente del pH del suelo. De este modo, se ha observado que la deficiencia de hierro debido a alto pH del medio, provocado por la adición de bicarbonato, induce la deficiencia del elemento en la planta al reducir la capacidad de acidificación de las plantas (Martínez-Cuenca *et al.*, 2013b). Ello activa algunos genes relacionados con la respuesta para aumentar la absorción y transporte del elemento. Este comportamiento también se ha observado en plantas de melocotonero (Molassiotis *et al.*, 2006). Lo más probable es que el bicarbonato presente en el apoplasto radicular neutraliza los protones bombeados fuera del citosol, impidiendo la generación del gradiente electroquímico transmembrana que constituye la fuerza motriz para el transporte de ion ferroso (Zocchi and Cocucci, 1990).

c) Acidificación del entorno de la rizosfera

Liberación de protones al medio del cultivo. Ya se ha comentado que, en nuestras condiciones de suelo básicos, los cítricos ponen frecuentemente en acción toda una serie de mecanismos metabólicos para lograr una asimilación más eficiente del hierro presente en el sustrato. Particularmente, los cítricos han desarrollado un potente sistema de aci-

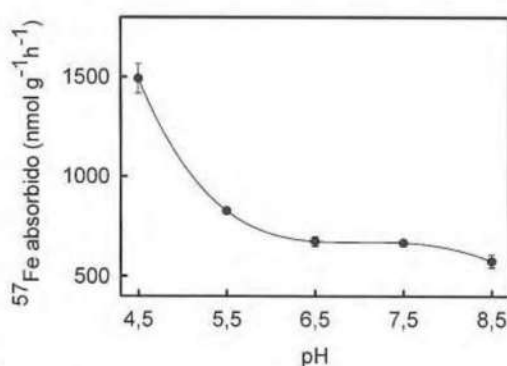


Figura 5. Absorción de $^{57}\text{FeEDDHA}$ en función del pH del medio externo medido en plántulas de c. Carrizo (CC). La absorción fue máxima a pH 4.5, reduciéndose conforme aumentó el pH de la solución aplicada.

dicación del medio mediante extrusión de protones y ácidos orgánicos, cuya finalidad es solubilizar el ion férrico localizado en el entorno del sistema radical. Así, cuando se compararon los dos patrones considerados en este estudio, se observó que ambos patrones aumentan la liberación de protones en ausencia de Fe, aunque no hubo diferencias entre ambos (Figura 6). Esta respuesta correlacionó marcadamente con la expresión del gen que regula la actividad de la enzima protón-ATPasa, clave en el proceso metabólico de generación de protones. Por tanto, la extrusión de protones al medio para solubilizar el ion férrico en el entorno del sistema radical es una respuesta desarrollada en cítricos en condiciones de deficiencia de hierro (Martínez-Cuenca *et al.*, 2013a). Esta respuesta ha sido observada en numerosos estudios en especies frutales y hortalizas y, en algunos casos, se advirtieron diferencias entre genotipos sensibles y tolerantes a la clorosis férrica en la capacidad para acidificar la rizosfera cuando el Fe escasea (Treeby and Uren 1993; Dell'Orto *et al.*, 2000; Donnini *et al.*, 2009; Jelali *et al.*, 2010a; Martínez-Cuenca *et al.*, 2013a, 2016).

Liberación de ácidos orgánicos al medio del cultivo. La acidificación del medio, estrategia ampliamente desarrollada en el reino vegetal, consiste en la estimulación de la síntesis de ácidos orgánicos y su posterior liberación al medio. En el presente trabajo se ha estudiado también el efecto de la deficiencia de hierro sobre su concentración en la savia y exudado de raíces de c. Carrizo cultivadas anteriormente (durante 4 meses) en presencia o ausencia de Fe en la solución nutritiva.

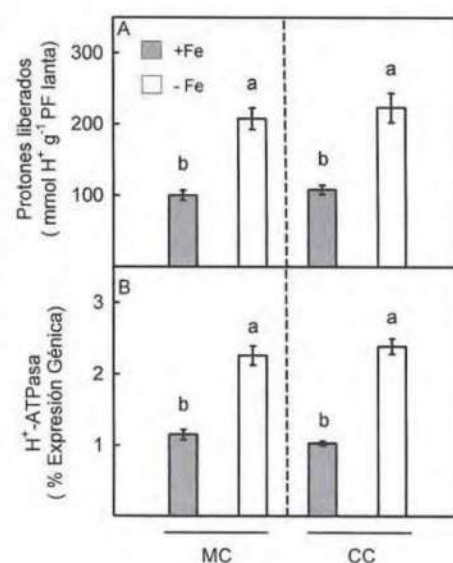


Figura 6. Capacidad acidificadora del sistema radical medida como (A) Liberación de protones y (B) Activación de la enzima protón-ATPasa, medido en plántulas de m. Cleopatra (MC) y de c. Carrizo (CC) cultivadas en presencia (+) o ausencia (-) de Fe en la solución nutritiva. En condiciones de déficit de este elemento, ambos patrones incrementaron significativamente su respuesta acidificadora, no apreciándose diferencias entre ellos.

El análisis de la concentración de ácidos, tanto en la savia de la planta como en el exudado de las raíces, reveló que los mayoritarios fueron el ácido málico y el cítrico, y que la deficiencia de Fe estimuló su concentración en ambos casos (Figuras 7 y 8).

Más aún, el estudio de la composición en ácidos orgánicos de los exudados de raíces mostró una marcada dependencia del pH del medio. Así, en la Figura 8 se observa un claro incremento de la exudación de ácidos orgánicos totales en condiciones de pH 7,0, más acentuada cuando sometemos las plántulas previamente a una solución deficitaria en Fe. En condiciones de pH ácido (5.0), la exudación de ácidos es menor y no se observaron diferencias entre plantas cultivadas en presencia y ausencia de este elemento. De modo que la deficiencia de hierro estimuló marcadamente la exudación de ácidos orgánicos, málico y cítrico, al medio.

Al parecer, la activación de la síntesis y excreción de ácidos orgánicos al medio en condiciones de deficiencia de hierro estaría provocada por la sobreexpresión de los genes relacionados con el metabolismo del ciclo de Krebs y, en especial, de la actividad de las enzimas Fosfoenol Piruvato Carboxilasa, Malatodes-hidrogenasa, Fumarasa y Citrato Sintasa, así como, del transportador de ácidos di-tricarboxílicos mitocondrial (Martínez-Cuenca *et al.*, 2013c).

Esta respuesta es coincidente con los resultados obtenidos en otras plantas como remolacha, guisante, alfalfa o kiwi (Andaluz *et al.*, 2002; Jelali *et al.*, 2010b; Rombolá *et al.*, 2002; Andaluz *et al.*, 2009), e incluso se ha asociado con la tolerancia de distintos genotipos de *Prunus* a la clorosis férrica (Jiménez *et al.*, 2011).

d) Capacidad reductora del Fe^{3+} a Fe^{2+} del sistema radicular

En este ensayo se estudió el comportamiento de la enzima Fe-quelato reductasa (FCR) en ambos patrones (m. Cleopatra y en c. Carrizo) y su respuesta también en condiciones previas de clorosis. En presencia de concentraciones crecientes de sustrato, la enzima se ajusta, en todos los casos, a una cinética característica de Michaelis-Menten (Figura 9). En ambos patrones, la deficiencia de hierro indujo muy positivamente la actividad de la enzima. El patrón más tolerante, m. Cleopatra, presentó una mayor inducción lo cual sugiere, por consiguiente, una mayor eficiencia en la reducción de hierro por parte de su sistema radical.

La actividad de la enzima Fe-quelato reductasa (FCR), responsable de reducir las formas férricas a ferrosas, se indujo significativamente en condiciones de déficit previo de hierro tanto en el patrón tolerante como en el sensible, indicando la estrecha relación entre la capacidad de reducción de las raíces y la tolerancia a la clorosis férrica en los cítricos (Martínez-Cuenca *et al.*, 2013a).

Otros autores ya observaron esta respuesta en genotipos de las plantas leñosas (Dell'Orto *et al.*, 2000; Gogorcena *et al.*, 2004), incluyendo cítricos (Treeby and Uren, 1993). Además, la activación de la actividad de las enzimas FC-R y H^+ -ATPasa en las raíces de las plantas con deficiencia de hierro, ha sido considerada por algunos autores como una acción sinérgica de ambas enzimas para mejorar la adquisición de Fe, a través de la acidificación del apoplasto radicular y de la reducción de Fe^{3+} (Dell'Orto *et al.*, 2000; Donnini *et al.*, 2009; Jelali *et al.*, 2010a,b), como parece ocurrir en patrones de cítricos.

e) Transporte del ion ferroso (Fe^{2+}) al interior de la planta

Una vez que el hierro se encuentra en el medio en estado ferroso, ya está disponible para su absorción por parte de la planta, sin embargo necesita de un transportador que, localizado en las células epidérmicas de la raíz, le permita entrar al

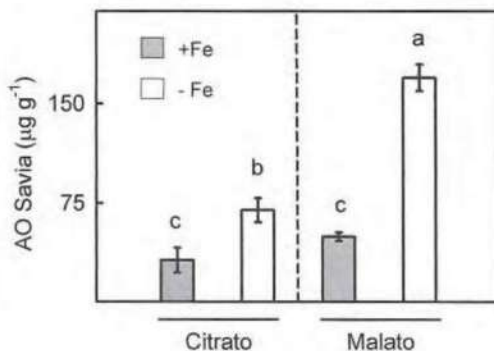


Figura 7. Concentración de los principales ácidos orgánicos en la savia de plántulas de c. Carrizo cultivadas anteriormente en presencia (+) o ausencia (-) de Fe. Se observa que, en condiciones de déficit de hierro, el contenido de ácido cítrico y málico en la savia se incrementó significativamente, siendo de especial magnitud la del último.

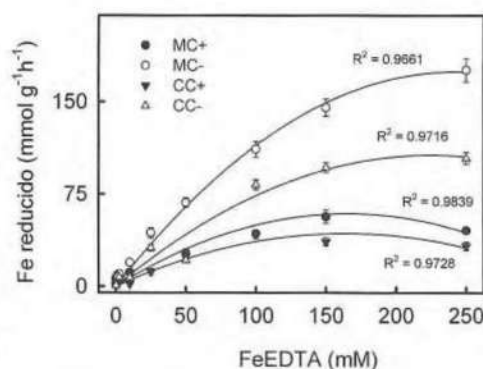


Figura 9. Actividad de la enzima Fe-quelato reductasa medida utilizando concentraciones crecientes de sustrato, en plántulas de m. Cleopatra (MC) y de c. Carrizo (CC) cultivadas previamente en presencia (+) o ausencia (-) de hierro en la solución nutritiva. En condiciones de déficit de este elemento, ambos patrones incrementaron significativamente la actividad de este enzima, si bien la inducción fue mayor en el patrón más tolerante.

interior de la planta. Este transportador se halla codificado por el gen IRT (Iron-Regulated Transporter) y ha sido ampliamente estudiado en otras especies herbáceas. El análisis de la expresión del ortólogo de este gen en los patrones considerados de cítricos, en condiciones de déficit o no de hierro en el medio, se muestra en la Figura 10. Los datos mostraron que en condiciones normales de disponibilidad de hierro en el medio, la expresión de dicho gen se encuentra significativamente más alta en el patrón más sensible a la clorosis. En condiciones de déficit previo de hierro, la actividad de este transportador es inducida en ambos casos, pero en mayor medida en el patrón más sensible. En general, el transporte del hierro, en estado ferroso, al interior de la planta es más activo en el patrón más sensible a la clorosis férrica, incrementándose muy sig-

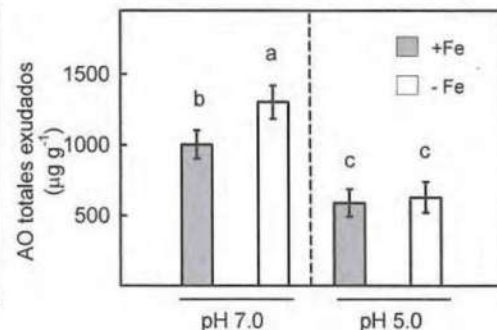


Figura 8. Concentración de ácidos orgánicos totales exudados durante 12 h en plántulas de c. Carrizo cultivadas previamente en presencia (+) o ausencia (-) de Fe. Se observa que, mientras que a pH neutro (7.0) existe una marcada exudación de ácidos orgánicos en condiciones de déficit de hierro, a pH ácido (5.0) tales diferencias desaparecen.

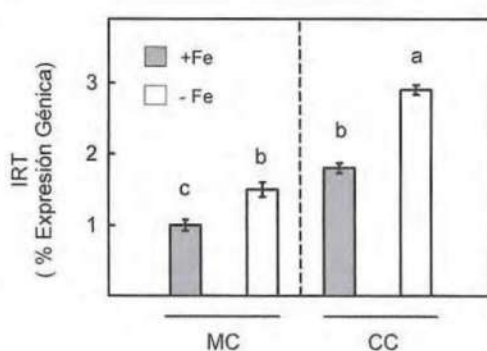


Figura 10. Expresión del gen que codifica para el transportador IRT (Iron-Regulated Transporter) medida en plántulas de m. Cleopatra (MC) y de c. Carrizo (CC) y cultivadas anteriormente en presencia (+) o ausencia (-) de hierro en la solución nutritiva. En condiciones normales, este gen se encuentra más inducido en el patrón más sensible. Adicionalmente, en condiciones de déficit de este elemento, ambos patrones incrementaron significativamente la actividad de este transportador.

nificativamente en condiciones previas de déficit de este elemento.

Esta observación podría indicar un papel clave del transportador IRT1 en la reacción de los patrones de cítricos ante condiciones de deficiencia de Fe, por el aumento de la capacidad del transporte de hierro en la raíz, de acuerdo con informes anteriores sobre *Arabidopsis* (Cohen *et al.*, 1998; Vert *et al.*, 2002) y recientemente en cítricos (Martínez-Cuenca *et al.*, 2013a). A larga distancia, Manthey *et al.* (1994) advirtieron que el ^{55}Fe transportado a los tallos y hojas fue proporcional al Fe activamente absorbido por las raíces en condiciones de ausencia del elemento o de deficiencia inducida por presencia de bicarbonato en el medio (Martínez-Cuenca *et al.*, 2013b).

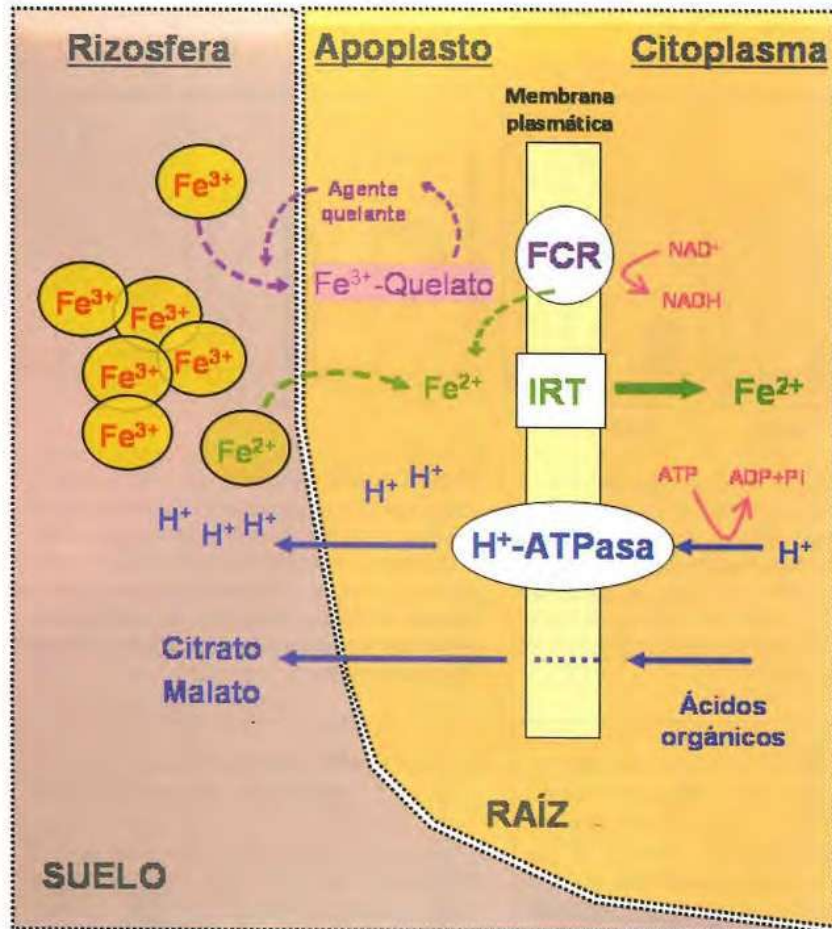


Figura 1. Esquema que ilustra las respuestas de los cítricos a la deficiencia de hierro. Tal y como se observa, son varios los mecanismos implicados, por una parte la solubilización del hierro del medio mediante la acidificación por extrusión de protones y liberación de ácidos orgánicos; por otra parte, la reducción de las formas férricas de la solución del suelo y, finalmente, el transporte de las formas ferrosas al interior de la planta (Fe³⁺: forma férrica; Fe²⁺: forma ferrosa; H⁺: protones; H⁺-ATPasa; enzima protón-ATPasa; FCR: enzima quelato reductasa; IRT: transportador).



Figura 2. Sintomatología de la deficiencia de hierro en hojas de naranjo Valencia. Se observa una marcada deficiencia en las hojas de la brotación de otoño que contrasta con el buen estado nutricional de las hojas de primavera.



Figura 3. Sintomatología de la deficiencia de hierro en frutos de naranjo Valencia. En la fila inferior se muestran frutos procedentes de árboles deficientes, de menor calibre y corteza de coloración anormalmente amarillenta.

VIVEROS

CENTRALES

*Plantas como
deben ser*

SAT nº 6439

Miembro de AVASA

**Viveros autorizados por el Ministerio de Agricultura
para la producción de plantas tolerantes a la tristeza**

Disponemos de todas las variedades

■ **Clementina:**

Oronules, Orogrande, Clemenules, Esbal, Hernandina, Nour, Marisol, Arrufatina, Loretina®.

■ **Híbridos:**

Fortune, Nova, Ortanique.

■ **Naranja:**

Navelina, Navel, Salustiana, Newhall, Valencia-Late, Navelate, Navel - Lane-Late, Delta Seedles,

■ **Pomelo:**

Star-Ruby, Río Red.

■ **Satsuma:**

Clausellina, Okitsu, Owari.

■ **Limonero:**

Verna, Eureka, Fino.

■ **Pies:**

C. Carrizo, M. Cleopatra, Macrophylla, C. Volkameriana, Citrumelo, C-35

NOVEDADES

■ **Clemenrubi.**

■ **Valencia Midnight.**

■ **Power Summer Navel.**

CONCLUSIÓN FINAL

De los estudios llevados a cabo en esta investigación se deducen los hallazgos siguientes:

- La deficiencia de Fe estimuló la actividad de las enzimas H^+ -ATPasa y F-CR (Fe-quelato reductasa), y del transportador férrico en las raíces, para incrementar la movilización de Fe en la rizosfera, la capacidad de reducción del mismo por las raíces y de su transporte al interior de la célula.

- Por otro lado, el déficit de este micro-nutriente también provocó la acumulación de ácidos orgánicos en el sistema radical de las plantas, principalmente citrato y malato, que son liberados al medio y al xilema, para facilitar la solubilización, reducción y transporte del Fe.

- La capacidad de absorción del hierro por las raíces tuvo una alta dependencia del pH de la solución.

- Finalmente, el grado de tolerancia entre diferentes genotipos a la clorosis férrica está determinado por la regulación de estos componentes, siendo determinante la activación del enzima F-CR.

Por todo ello, las raíces de los cítricos responden a la deficiencia de Fe aumentando la actividad de los componentes del sistema de absorción de este elemento descrito en plantas dicotiledóneas como "estrategia I".

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la financiación recibida del Ministerio de Ciencia e Innovación mediante los proyectos RTA2004-64 y RTA2011-00127, y por la beca predoctoral a M.R. Martínez-Cuenca del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). Asimismo, agradecen a M^a Carmen Prieto, M^a Teresa García y Carmen Casamayor por su apoyo técnico y a Jesús Asensi y Ramón Pardo por el mantenimiento de las plantas.

BIBLIOGRAFÍA

Abadía J., López-Millán A. F., Rombolá A., Abadía, A. 2002. Organic acids and Fe deficiency, a review. *Plant and Soil*, 241: 75-86.

Andaluz S., López-Millán A. F., Peleato M. L., Abadía J., Abadía A. 2002. Increases in phosphoenolpyruvate carboxylase activity in iron-deficient sugar beet roots: Analysis of spatial localization and post-translational modification. *Plant and Soil*, 241: 43-48.

Andaluz S., Rodríguez-Celma J., Abadía A., Abadía J., López-Millán A.F. 2009. Time course induction of several key enzymes in Medicago truncatula roots in response to Fe deficiency. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47:1082-1088.

Bienfait H.F., Bino R.J., van der Bliek A.M., Duivenvoorden J.F., Fontaine J.M. 1983. Characterization of ferric reducing activity in roots of Fe deficient *Phaseolus vulgaris*. *Physiologia Plantarum*, 59: 196-202.

Chouliaras V., Therios I., Molassiotis A., Diamantidis, G. 2004. Iron chlorosis in grafted sweet orange (*Citrus sinensis* L.) plants: physiological and biochemical response. *Biologia Plantarum*, 48: 141-144.

Cohen C.K., Fox T., Norvell W.A., Kochian L.V. 1998. The role of iron-deficiency stress responses in stimulating heavy-metal transport in plants. *Plant Physiology*, 116: 1063-1072.

De Vos C. R., Lubberding H. J., Bienfait H. F. 1986. Rhizosphere acidification as a response to iron deficiency in bean plants. *Plant Physiology*, 81: 842-846.

Dell'Orto M., Santi S., De Nisi P., Cesco S., Varanini Z., Zocchi G., Pinton R. 2000. Development of Fe-deficiency responses in cucumber (*Cucumis sativus* L.) roots: involvement of plasma membrane H^+ -ATPase activity. *Journal of Experimental Botany*, 51: 695-701.

Dell'Orto M., Pirovano L., Villalba J. M., Gonzalez-Reyes J. M., Zocchi G. 2002. Localization of the plasma membrane H^+ -ATPase in Fe-deficient cucumber roots by immunodetection. *Plant and Soil*, 241: 11-17.

Donnini S., Castagna A., Ranieri A., Zocchi G. 2009. Differential responses in pear and quince genotypes induced by Fe deficiency and bicarbonate. *Journal of Plant Physiology*, 166: 1181-1193.

Eide D., Broderius M., Fett J., Gueriot M. L. 1996. A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 93: 5624-5628.

Emery T. 1982. Iron metabolism in human and plants. *American Scientist*, 70: 626-632.

FAO. 2014. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.

Gogorcena Y., Abadía J., Abadía A. 2004. New technique for screening iron-efficient genotypes in peach rootstocks: Elicitation of root ferric chelate reductase by manipulation of external iron concentrations. *Journal of Plant Nutrition*, 27: 1701-1715.

Jelali N., Dell'Orto M., Rabhi M., Zocchi G., Abdely C., Gharsalli M. 2010a. Physiological and biochemical responses for two cultivars of *Pisum sativum* ("Merveille de Kelvedon" and "Lincoln") to iron deficiency conditions. *Scientia Horticulturae*, 124: 116-121.

Jelali N., M'sehli W., Dell'Orto M., Abdely C., Gharsalli M., Zochim G. 2010b. Changes of metabolic responses to direct and induced Fe deficiency of two *Pisum sativum* cultivars. *Environmental and Experimental Botany*, 68: 238-246.

Jiménez S., Ollat N., Deborde C., Maucourt M., Rellán-Álvarez R., Moreno M. A., Gogorcena Y. 2011. Metabolic response in roots of *Prunus* rootstocks submitted to iron chlorosis. *Journal of Plant Physiology*, 168: 415-423.

Kim S.A., Gueriot M.L. 2007. Mining iron: Iron uptake and transport in plants. *Febs Letters*, 581: 2273-2280.

Kloepper J.W., Leong J., Teintze M., Schroth M.N. 1980. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature*, 286: 885-886.

Legaz F., Serna M.D., Primo-Millo E. 1995. La deficiencia de hierro en los cítricos. En: Hojas Divulgativas Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. Servicio de Transferencia de Investigación y Tecnología Agraria. Conselleria d'Agricultura, Pesca i Alimentació. Generalitat Valenciana.

Legaz F., Quiñones A., Martínez-Alcántara B., Primo-Millo E. 2008. Fertilización de los cítricos en riego a goteo II: Mg y microelementos. *Levante Agrícola*, 400: 8-12.

Lindsay W.L. 1995. Chemical reactions in soils that affect iron availability to plants. A quantitative approach. pp.: En: Iron Nutrition in Soils and Plants. Abadía, J. ed.; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands.

MAGRAMA. 2014. Encuesta sobre superficies y rendimientos (ESYRCE). Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente.

Martínez-Cuenca M.R., Forner-Giner M.A., Iglesias D.J., Primo-Millo E., Legaz F. 2013a. Strategy I responses to Fe-deficiency of two Citrus rootstocks differing in their tolerance to iron chlorosis. *Scientia Horticulturae*, 153: 56-63.

Martínez-Cuenca M.R., Iglesias D.J., Forner-Giner M.A., Primo-Millo E., Legaz F. 2013b. The effect of sodium bicarbonate on plant performance and iron acquisition system of FA-5 (Forner-Alcalde 5) citrus seedlings. *Acta Physiologia Plantarum*, 35: 2853-2845.

Martínez-Cuenca M.R., Iglesias D.J., Talon M., Abadía J., López-Millán A. F., Primo-Millo E., Legaz F. 2013c. Metabolic responses to iron deficiency in roots of Carrizo citrange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck. x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.]. *Tree Physiology*, 33: 320-329.

Martínez-Cuenca M.R., Quiñones A., Forner-Giner M.A. 2016. Screening of 'King' mandarin (*Citrus nobilis* Lour.) x *Poncirus trifoliata* ((L.) Raf.) hybrids as citrus rootstocks tolerant to iron chlorosis. *Scientia Horticulturae*, 198: 61-69.

Marschner H., Römhelt V. 1994. Strategies of plants for acquisition of iron. *Plant and Soil*, 165: 261-274.

Mengel K. 1994. Iron availability in plant tissues - iron chlorosis on calcareous soils. *Plant and Soil*, 165(2): 275-283.

Molassiotis A., Tanou G., Diamantidis G., Patakas A., Therios I. 2006. Effects of 4-month Fe deficiency exposure on Fe reduction mechanism, photosynthetic gas exchange, chlorophyll fluorescence and antioxidant defence in two peach rootstocks differing in Fe deficiency tolerance. *Journal of Plant Physiology*, 163: 176-185.

Murphy T.P., Lean D.R.S., Nalewajko C. 1976. Blue green algae: their excretion of iron-selective chelators enables them to dominate other algae. *Science*, 192: 900-902.

Olsen R.A., Clark R.B., Bennett J.H. 1981. The enhancement of soil fertility by plant roots. *American Scientist*, 69: 378-384.

Pestana M., David M., Varennes A., Abadía J., Araújo Faria E. 2001. Responses of "Newhall" orange trees to iron deficiency in hydroponics: effects on leaf chlorophyll, photosynthetic efficiency, and root ferric chelate reductase activity. *Journal of Plant Nutrition*, 24: 1609-1620.

Rabotti G., De Nisi P., Zocchi G. 1995. Metabolic implications in the biochemical responses to iron deficiency in cucumber (*Cucumis sativus* L.) roots. *Plant Physiology*, 107: 1195-1199.

Rombolá A.D., Brüggemann W., López-Millán A. F., Tagliavini M., Abadía J., Marangoni B., Moog P.R. 2002. Biochemical responses to iron deficiency in kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). *Tree Physiology*, 22: 869-875.

Römhelt V., Marschner H. 1983. Mechanism of iron uptake by peanut plants. I. Fe(III) reduction; chelate splitting; and release of phenolics. *Plant Physiology*, 71: 949-954.

Römhelt V., Marschner H. 1986. Mobilization of iron in the rhizosphere of different plant species. pp.: 155-204. En: Advance in plant nutrition. vol.2. Tinker B. y Läuchli A. eds; Praeger Scientific, New York.

Römhelt V. 2000. The chlorosis paradox: Fe inactivation in leaves as a secondary event in Fe deficiency chlorosis. *Journal of Plant Nutrition*, 23(11-12): 1629-1643.

Santi S., Cesco S., Varanini Z., Pinton R. 2005. Two plasma membrane H^+ -ATPase genes are differentially expressed in iron-deficient cucumber plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43: 287-292.

Schmidt W. 1999. Mechanisms and regulation of reduction-based iron uptake in plants. *New Phytologist*, 141: 1-26.

Susin S., Abadía A., Gonzalez-Reyes J.A., Lucena J.J., Abadía J. 1996. The pH requirements for in vivo activity of the iron-deficiency "turbo" ferric chelate reductase. *Plant Physiology*, 110: 111-123.

Treby M y Uren N. 1993. Iron deficiency stress responses amongst citrus rootstocks. *Z. Pflanz Bodenk.*, 156:75-81.

Uren N.C. 1984. Forms, reactions and availability of iron in soils. *Journal of Plant Nutrition*, 7(1-5): 165-176.

Vert G. A., Grotz N., Dedaldechamp F., Gaymard F., Gueriot M. L., Briat J. F., Curie C. 2002. IRT1 an *Arabidopsis* transporter essential for iron uptake from the soil and plant growth. *Plant Cell*, 14: 1223-1233.

Wei L.C., Loeppert R.H., Oculup W.R. 1997. Fe-deficiency stress response in Fe-deficiency resistant and susceptible subterranean clover: importance of induced H^+ release. *Journal of Experimental Botany*, 48: 239-246.

Yi Y., Gueriot M.L. 1996. Genetic evidence that induction of root Fe(III) chelate reductase activity is necessary for iron uptake under iron deficiency. *Plant Journal*, 10: 835-844.

Zocchi G., Cocucci S.M. 1990. Fe uptake mechanism in Fe-efficient cucumber roots. *Plant Physiology*, 92: 908-911.